

¿Es la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos determinada en ratas un predictor del efecto del procesamiento en harina de pescado?

M. Gutiérrez Coronado, L. García-Rico, F. Vázquez-Ortiz,
Y. López-Franco y P. García-Andrade

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 0.6.
Apartado Postal # 1735. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000
Recibido Marzo 1, 2006. Aceptado Junio 7, 2007

Is the ileal apparent digestibility of amino acids in rats a predictor of heating effects on fishmeal?

ABSTRACT. The aim of the study was to determine the ileal apparent digestibility of aminoacids (AA) through a rat bioassay, as a predictor of the effect of processing (pelletized, extrusion) of fishmeal (FM1 and FM2). An animal model of 24 male Sprague-Dawley rats (190 g bodyweight) was used. Rats were allotted to two groups and housed individually in stainless steel wire-bottomed cages in a room maintained at 25°C with a 12 h light/ dark cycle and were fed diets containing fishmeal (FM1 or FM2) as the sole protein source. Chromic oxide (0.4%) was included in the diet as an indigestible marker. The rats were trained to consume the diets during a single 3-hour period (8:30 - 11:30 h) for 7 d. Then for another 7 d the experimental diets were offered. In the last three experimental days feeding times were staggered to allow killing the individual rats 4 h after the initiation of feeding. The ileal AA digestibilities (%) for FM1 and FM2 were respectively: lysine 89, 87; methionine 86, 85; histidine 82, 85; phenylalanine 82, 86; tyrosine 84, 80; threonine 78, 72; leucine 87, 87; isoleucine 83, 84; valine 87, 89; aspartic ac. 71, 73; serine 76, 73; glutamic ac. 85, 83; glycine 75, 72; alanine 86, 84; arginine 85, 86. The high ileal digestibility values reflect good quality in both fishmeals. There were no significant differences in ileal AA digestibility values between the two fishmeals analyzed, despite the higher temperature generated during the extrusion process. The ileal AA apparent digestibility is not a good predictor for the adequacy of thermal processing, since AA suffering thermal damage may be capable of being absorbed but are inefficiently utilized. It is recommended that studies related to true AA availability, especially that of lysine be conducted.

Key words: aminoacids, extrusion, fishmeal, ileal digestibility, pelletized, rats

RESUMEN. El objetivo del estudio fue determinar la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos a través de un bioensayo con ratas, como predictor del efecto del procesamiento (peletizado y extrusión) en harina de pescado (HP1, HP2). Se utilizó un modelo animal de 24 ratas Sprague-Dawley de 190 g de peso inicial divididas en dos grupos, ofreciéndoles una dieta conteniendo harina de pescado como única fuente proteica y 0.4% de óxido de cromo como marcador. Se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable, bajo condiciones controladas y con libre acceso al agua. Las ratas fueron entrenadas para consumir alimento por tres horas 8:30 - 11:30 h) durante 7 d. Las dietas experimentales se ofrecieron por 7 d. Los tres últimos días experimentales el alimento se introdujo en forma desfasada, sacrificando las ratas cuatro horas después de iniciada la alimentación. Los porcentajes de digestibilidad ileal para HP1 y HP2 fueron respectivamente: lisina 89, 87; metionina 86, 85; histidina 82, 85; fenilalanina 82, 86; tirosina 84, 80; treonina 78, 72; leucina 87, 87; isoleucina 83, 84; valina 87, 89; ac aspártico 71, 73; serina 76, 73; ac glutámico 85, 83; glicina 75, 72; alanina 86, 84; arginina 85, 86. No se encontró diferencia significativa en los valores de digestibilidad ileal de AA, a pesar de la temperatura más alta que se genera durante la extrusión. La digestibilidad ileal no es un buen predictor de la pertinencia del tratamiento térmico, ya que los AA que sufren daño térmico se pueden absorber pero no utilizar en síntesis de proteínas corporales. Se recomienda realizar estudios de disponibilidad verdadera de AA, especialmente de lisina.

Palabras clave: aminoácidos, digestibilidad ileal, extrusión, harina de pescado, peletizado, ratas

INTRODUCCIÓN

En un gran número de países las materias primas de origen animal, como la harina de pescado (HP), juegan un papel muy importante en la formulación de dietas, suministrando aminoácidos (AA) esenciales a animales en etapa de desarrollo. La calidad de estas materias primas difiere grandemente entre lugares, origen y procedencia. Además, la digestibilidad y disponibilidad de los AA son afectadas por la forma en que las harinas son preparadas, procesadas y almacenadas (Knabe *et al.*, 1989). El conocimiento de estos factores es limitado, en especial lo referente al efecto del tratamiento térmico. Se dispone de poca información que permita predecir el efecto de este tratamiento en la digestibilidad y disponibilidad de los AA, a pesar de que una gran amplitud de temperaturas y tiempo de duración del tratamiento térmico se aplican a las proteínas de origen animal (Mora-Cornejo *et al.*, 2000).

Además de que el efecto del procesamiento en la digestibilidad aparente de los AA depende del ingrediente analizado (Cheng y Hardy, 2003).

La digestibilidad ileal de los AA de un lote específico de HP se puede evaluar utilizando cerdos canulados en el ileon y alimentados con el ingrediente en cuestión. Sin embargo, este es un procedimiento caro y de larga duración. Se ha desarrollado un procedimiento más barato que utiliza ratas, y su aplicabilidad a cerdos ya ha sido demostrada para otras harinas de subproductos de origen animal (Donkoh *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1999). Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos a través de un bioensayo con ratas, como predictor del efecto del procesamiento (peletizado y extrusión) en harina de pescado, para su uso en la alimentación de cerdos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El bioensayo realizado se llevó a cabo en la Unidad Metabólica Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., localizado en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México, de acuerdo a los lineamientos acerca del cuidado y uso de animales de experimentación estipulados por el Comité de Ética de la Institución. Se evaluó harina de pescado de origen sudamericano "super-prime", sometida a dos procesos industriales: peletizado con vapor y extrusión. La harina de pescado peletizada (HP1) y extruida (HP2) fueron proporcionadas por una compañía de alimentos balanceados. La descripción de su composición química y perfil de aminoácidos, determinados en el laboratorio, se muestra en el Cuadro 1. El peletizado con vapor utiliza humedad, calor y presión. El vapor es añadido a la harina de pescado para incrementar el contenido de humedad de 15 a 18% y la temperatura de 70 a 85°C. Mientras que la extrusión utiliza una combinación de presión, calor y fricción, generándose temperaturas de 90 a 150°C por la fricción en el extrusor. Además el contenido de humedad es mayor que en el peletizado (18-21%), requiriendo de un secado a altas temperaturas por periodos prolongados de tiempo.

Dietas y Alojamiento de Animales

Se utilizó un modelo animal de 24 ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente siete sema-

nas de edad y 190 ± 5 g de peso inicial promedio divididas en dos grupos, alimentadas con las dietas experimentales conteniendo HP1 (grupo 1) y HP2 (grupo 2) como única fuente proteica y 0.4% de óxido de cromo como marcador no digestible (Cuadro 2). La asignación de las dietas a las unidades experimentales (ratas) fue aleatoria. Las ratas fueron alojadas individualmente en jaulas de acero inoxidable a 25°C, una humedad relativa de 50 a 65%, ciclo de luz-oscuridad de 12 h y libre acceso al agua (Arrington, 1972).

Alimentación

Las ratas fueron alimentadas con una dieta a base de caseína por tres días para su adaptación a la llegada al bioterio y fueron entrenadas para consumir la dieta por un período de tres horas (8:30 a 11:30 h) durante 7 d. Posteriormente se suministraron las dietas experimentales, las cuales se ofrecieron por 7 d más por el periodo de tres horas al que fueron entrenadas, ya que la mayor excreción de cromo es diurna. Durante los últimos tres días del período experimental la introducción del alimento se hizo en forma desfasada (dos minutos entre rata y rata), de tal forma que las ratas se sacrificaran cuatro horas después del inicio de la alimentación.

Cuadro 1. Composición química de harina de pescado peletizada y extruída (%)

	Harina de pescado peletizada	Harina de pescado extruída
Materia seca	92.10	92.74
Proteína	71.30	71.61
NNP ¹	1.26	1.24
Proteína-NNP	70.00	70.30
Grasa	9.34	9.89
Ceniza	14.13	14.21
<u>AA esenciales</u>		
Lisina	8.11	7.85
Metionina	2.38	2.32
Histidina	3.10	2.76
Fenilalanina	3.38	3.29
Tirosina	2.68	2.45
Treonina	3.64	3.53
Leucina	6.65	6.44
Isoleucina	3.93	3.87
Valina	4.37	4.41
<u>AA no esenciales</u>		
Ac. aspártico	7.70	7.72
Serina	2.69	2.55
Ac. glutámico	11.79	11.41
Glicina	7.07	7.03
Alanina	6.30	5.98
Arginina	5.89	5.52

¹Nitrógeno no proteico**Colección de la Muestra de digesta ileal**

Al término del suministro de las dietas experimentales las ratas fueron anestesiadas con cloroformo confinadas en un desecador. Se trasladaron a una cama de cirugía y la cavidad abdominal se abrió para identificar la parte final del intestino delgado (ileon), removiéndose la digesta por resección de un segmento ileal de 20 cm a partir de la válvula ileocecal, por perfusión intraluminal con agua destilada. Las muestras fueron secadas en un liofilizador de charolas, se molieron en un mortero y se congelaron a -20°C. Se combinaron muestras ileales de tres ratas, conformándose cuatro grupos

para la HP1 y cuatro grupos para la HP2, de tal forma que se obtuvieron ocho muestras de digesta ileal para analizar.

Análisis Químicos

La composición química de las harinas de pescado fue determinada por las técnicas oficiales del AOAC (1990). A las muestras de digesta ileal, así como a las dietas ofrecidas se les determinó cromo y aminoácidos. Cromo se determinó por espectroscopia de absorción atómica (Espectrofotómetro VARIAN Spectra AA-20) y digestión de las muestras por energía de microondas MDS-81D

Cuadro 2. Composición porcentual de las dietas experimentales

Ingrediente	Inclusión (%)
Harina de pescado	20.0
Aceite de maíz	5.0
Vitaminas y minerales	1.5
Celulosa	3.0
Óxido de cromo	0.4
Almidón	62.1
Dextrosa	8.0

(Corp., Matthews, NC, USA) de acuerdo a la metodología de García-Rico *et al.*, (1999). Los aminoácidos se determinaron en un Cromatógrafo VARIAN 9012 según el método de Vázquez *et al.*, (1997). La estimación de la digestibilidad aparente ileal de AA se calculó por el método indirecto del marcador óxido de cromo, de acuerdo a la siguiente fórmula: $D = 1 - (a \times d) / (b \times c)$, donde D = digestibilidad, a = marcador en la dieta, b = aminoácidos en la dieta, c = marcador en la digesta ileal, d = amino-ácidos en la digesta ileal.

Análisis Estadístico

Las variables fueron la digestibilidad ileal de los AA de las harinas de pescado 1 y 2. Se utilizó un modelo estadístico lineal y se probó la hipótesis de si hay o no diferencia en los valores de digestibilidad ileal de los AA entre las harinas de pescado evaluadas. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis descriptivo y se sometieron a un análisis de varianza de una vía, con un nivel de significancia de 0.05 usando el programa estadístico NCSS 6.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de digestibilidad ileal aparente de los AA analizados en este estudio se muestran en el Cuadro 3. De acuerdo al análisis estadístico realizado, no se encontró diferencia significativa en los valores de digestibilidad ileal para ninguno de los AA analizados, a pesar de que durante el proceso de extrusión se generan temperaturas más altas por la fricción en el extrusor. Sin embargo, sí se encontró una tendencia numérica de disminución en la digestibilidad ileal de la mayoría de los AA de la harina de pescado extruida. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por

Van Barneveld *et al.*, (1994) con chícharos (*Pisum sativum*) tratados térmicamente de 100 a 165°C, en el que no se encontró diferencia significativa para los valores de digestibilidad ileal de la mayoría de los AA, pero sí un decremento gradual en la digestibilidad ileal a temperaturas altas de procesamiento. Inicialmente la aplicación de calor mejoró la digestibilidad de 75% en chícharos crudos a 82% en chícharos calentados a 110°C, después declinó gradualmente a 78% (135°C), 75% (150°C) y a 62% en chícharos (*Pisum sativum*) calentados a 160 °C. Booth *et al.* (2002), encontraron que

Cuadro 3. Comparación de medias de la digestibilidad aparente ileal de aminoácidos de harina de pescado peletizada y extruida (%)¹

	Harina de pescado peletizada	Harina de pescado extruida	Nivel de probabilidad	Error Estándar
<u>AA esenciales</u>				
Lisina	89 ± 1.70	87 ± 3.59	0.35	1.40
Metionina	86 ± 1.25	85 ± 3.40	0.79	1.28
Histidina	82 ± 1.29	85 ± 5.67	0.38	2.05
Fenilalanina	82 ± 1.70	86 ± 3.78	0.16	1.46
Tirosina	84 ± 1.70	80 ± 5.29	0.17	1.96
Treonina	78 ± 2.87	72 ± 7.04	0.19	2.68
Leucina	87 ± 1.73	87 ± 3.59	0.71	1.41
Isoleucina	83 ± 1.25	84 ± 4.03	0.65	1.49
Valina	87 ± 1.25	89 ± 3.40	0.31	1.28
<u>AA no esenciales</u>				
Ac. Aspártico	71 ± 3.91	73 ± 7.45	0.69	2.97
Serina	76 ± 3.09	73 ± 6.99	0.46	2.70
Ac. Glutámico	85 ± 1.70	83 ± 3.55	0.71	1.39
Glicina	75 ± 3.94	72 ± 7.18	0.42	2.89
Alanina	86 ± 1.25	84 ± 3.59	0.46	1.34
Arginina	85 ± 0.95	86 ± 4.04	0.07	0.87

¹Valores expresados como media ± desviación estándar, n = 4. (P < 0.05)

los coeficientes de digestibilidad aparente de nitrógeno determinados en tres dietas para peces, que fueron peletizadas en frío, peletizadas al vapor y extruídas, respectivamente, no se vieron afectados por el procesamiento. Sin embargo, la ganancia de peso y la velocidad de crecimiento de los peces alimentados con la dieta peletizada al vapor fueron superiores a los alimentados con la dieta extruída, evidenciando la mejor calidad nutricional de la harina peletizada con respecto a la extruída. De igual manera, Cheng y Hardy (2003), reportaron que el proceso de extrusión redujo el coeficiente de digestibilidad aparente de proteína de soya, cebada y trigo en estudios realizados en trucha. Geoff y Booth (2004), en estudios realizados en peces observaron que la extrusión mejoró grandemente la digestibilidad de proteína de chícharos, en menor grado la de soya, y que fue detrimental para canola. Estos estudios evidencian la importancia de que la digestibilidad ileal de AA no predice un posible daño térmico y que depende tanto de la materia prima analizada como de la especie utilizada en el bioensayo.

En este estudio se encontraron tendencias a la baja en los porcentajes de digestibilidad ileal para algunos AA de la HP2. Este posible decremento en digestibilidad podría deberse, ya sea a un tratamiento térmico insuficiente o a un exceso de calor aplicado (Parsons *et al.*, 1992). Un tratamiento térmico inadecuado provoca un decremento en la digestibilidad de todos los AA, mientras que un tratamiento térmico excesivo reduce la digestibilidad de algunos AA en especial de lisina. En este estudio se obtuvieron reducciones numéricas para HP2 en la digestibilidad de la lisina, así como también de metionina, tirosina, serina, glutámico, glicina y alanina. La digestibilidad de lisina se redujo de 89 a 87%. Esta digestibilidad reducida de lisina se puede deber tanto a la destrucción del AA, ya que se obtuvo 3.2% de pérdida, como a la reducción de la digestibilidad de la lisina que no ha sido destruida (Parsons *et al.*, 1992). De igual manera, la digestibilidad de tirosina se redujo de 84 a 80% con un porcentaje de pérdida de 8.5. Para el caso de histidina y arginina, que presentan también los porcentajes más altos de pérdidas (10.96 y 6.28% respectivamente), la digestibilidad ileal se incrementó de 82 a 85% y de 85 a 86% respectivamente, indicando que el remanente de estos AA que no han sido destruidos no se ven afectados en su digestibilidad en el ileon.

El AA más digestible para HP1 fue lisina (89%) y para la HP2 valina (89%), coincidiendo este último con lo reportado por Cervantes *et al.*, (1997),

Knabe *et al.*, (1989) y Paraska, (2002), que la lisina no es el AA más digestible del perfil de AA analizados en harina de pescado. Ambos porcentajes de digestibilidad de lisina caen dentro de los límites reportados por Whittemore (1998) de 85-95%, considerándose harinas de pescado con digestibilidad media de lisina. Resultados similares se encontraron para metionina con digestibilidades de 86 y 85%, estando dentro del rango reportado por Whittemore (1998) de 85-95%. Las digestibilidades más bajas fueron para aspártico (71,73%), glicina (75, 72%) y treonina (78, 72%), concordando con las harinas analizadas por Knabe *et al.*, (1989) y Paraska (2002), pero no con los resultados de Cervantes *et al.*, (2000). Sin embargo, los valores reportados por este último autor son muy homogéneos y no presentan la variabilidad típica de las digestibilidades determinadas en el ileon. La baja digestibilidad de la glicina se puede deber a que este AA es uno de los principales componentes de la proteína endógena. En general, los valores encontrados en este estudio, los cuales se obtuvieron de un bioensayo con ratas y utilizando la técnica del sacrificio para la colección de la muestra ileal, coinciden con los valores consultados en la literatura, los cuales se obtuvieron utilizando cerdos canulados.

Se ha reportado que la aplicación de calor a las proteínas puede inducir cambios en su molécula que tienen poco efecto en su digestibilidad pero deja a los aminoácidos absorbidos menos disponibles (Hurell y Carpenter, 1981). Después de la digestión, los aminoácidos alterados por el calor pueden ser metabolizados en las paredes intestinales y por consiguiente no absorberse en la sangre portal. Numerosos estudios muestran que algunos de los compuestos formados por las proteínas con la aplicación de calor, tales como compuestos de Maillard (fructosolisina) o isopéptidos formados por enlaces cruzados proteína-proteína pueden ser digeridos pero son ineficientemente utilizados (Bjarnason y Carpenter, 1970; Hurell y Carpenter, 1974).

La digestibilidad aparente ileal no es lo suficientemente sensible para detectar daños en los aminoácidos por efecto de un tratamiento térmico excesivo, en especial de lisina, ya que por su estructura química es el AA más termolábil (Van Barneveld *et al.*, 1994; Moughan *et al.*, 1996). La lisina dañada forma compuestos que se pueden absorber, por lo que la digestibilidad ileal no se afecta, pero no se pueden utilizar para síntesis de proteína (Batterham, 1994). Se recomienda llevar a cabo la determinación de lisina disponible para

poder elucidar si la lisina sufrió daños durante el procesamiento térmico de las harinas de pescado analizadas (Moughan, 2005). Algunos AA como la valina, leucina e isoleucina, los cuales son metabolizados en el músculo, más que en el hígado, son menos sensibles a dañarse durante el

procesamiento y la digestibilidad ileal si puede reflejar su disponibilidad. Para treonina triptofano y fenilalanina, al igual que para lisina, es necesario determinar sus valores de disponibilidad en proteínas dañadas térmicamente.

CONCLUSIONES

No se encontró diferencia significativa en los valores de digestibilidad ileal de AA para la harina de pescado peletizada y harina de pescado extruída, pero sí una tendencia numérica ligeramente más alta para la harina de pescado extruída. A pesar de que el número de muestras analizadas fue pequeño, los resultados de este

estudio evidencian que la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos no es un buen predictor de daño térmico en proteínas tratadas térmicamente. Se recomienda realizar estudios de disponibilidad de AA con la medición de digestibilidad ileal verdadera, específicamente para lisina.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia .
- Arrington, L. R. 1972. Introductory laboratory animal science. The Interstate Printers & Publishers, Inc. Danville. p 111.
- Batterham, E. S. 1994. Ileal digestibilities of amino acid in feedstuffs for pigs. In: J. P. F. D'Mello (Ed.). Amino acids in farm animal nutrition. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Bjarnason, J., and K. J. Carpenter. 1970. Mechanisms of heat damage in proteins, 2. Chemical changes in pure proteins. *Br. J. Nutr.* 24:313-329.
- Booth, M. A., G. L. Allan, A. J. Evans and V. P. Gleeson. 2002. Effects of steam pelleting or extrusion on digestibility and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus*. *Aquac. Res.* 33 (14): 1163-1173.
- Cervantes-Ramírez, M., V. González-Vizcarra, S. Rodríguez-Rubí, J. Gonzalez-Monreal y L. Flores-Aguirre. 2000. Canulación duodenal e ileal para estudios de digestión en cerdos. *Agrociencia* 34: 135-139.
- Cervantes, M., G. Revuelta, V. González y M. Cuca. 1997. Apparent ileal amino acid digestibility in wheat, cotton seed meal, fish meal and meat meal in pigs. *J. Anim. Sci. (Suppl. 1)*: 186.
- Cheng, Z. J. and R. W. Hardy. 2003. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 9 (2): 77- 83.
- Donkoh, A., P. J. Moughan and W. C. Smith. 1994. The laboratory rat as a model animal for determining ileal amino acid digestibility in meat and bone meal for growing pig. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49:57-71.
- García-Rico L., R. E. Ramos-Ruiz and L. Gutiérrez-Coronado. 1999. Use of microwave digestion and atomic absorption spectrophotometry to determine chromic oxide as a digestibility marker in feed, feces and ileal content. *J. AOAC Int.* 82 (3): 575-578.
- Geoff, L. A and M. A. Booth. 2004. Effects of extrusion processing on digestibility of peas, lupins, canola meal and soybean meal in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) diets. *Aquac. Res.* 35 (10): 981- 992.
- Hurell, R. F. and K. J. Carpenter. 1974. Mechanisms of heat damage in proteins, 4. The reactive lysine content of heat damage material as measured in different ways. *Br. J. Nutr.* 32: 589-604.
- Hurell, R. F. and K. J. Carpenter. 1981. The estimation of available lysine in food stuffs after Maillard reactions. In: Progress in Food and Nutrition Science. Maillard Reactions in Food; Eriksson, L., (Ed.) Pergamon Press: Oxford, U.K. 5(1-6): 159-176.
- Knabe, D. A., D. C. La Rue, E. J. Gregg, G. M. Martinez and T. D. Tanksley Jr. 1989. Apparent digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs by growing pigs. *J. Anim. Sci.* 67:441-458.

- Mora-Cornejo, S. I., M. Cuca-García, A. Pro-Martínez y J. G. Herrera-Haro. 2000. Tiempo de calentamiento y digestibilidad verdadera de aminoácidos en harina de carne para gallos Leghorn. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 8 (1):8-12.
- Moughan, P. J., M. P. J. Gall and S. M. Rutherford. 1996. Absorption of lysine and deoxyketosyllysine in an early-Maillard brown casein by the growing pig. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1520-1525.
- Moughan, P.J. 2005. Absorption of chemically unmodified lysine from proteins in foods that have sustained damage during processing or storage. *J. AOAC Int.* 88 (3): 949-954.
- Paraska, N. 2002. Ileal and faecal amino acids digestibility of some tropical feedstuffs in growing pigs. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 36: 23-29.
- Parsons, C. M., K. Hashimoto, K. J. Wedwkind, Y. Han and D. H. Baker. 1992. Effect of over-processing on availability of amino acids and energy in soybean meal. *Poult. Sci.* 71:133
- Pearson, G., P. J. Moughan, G. Z. Dong and P. C. H. Morel. 1999. The rat as a model animal for determining apparent ileal amino acid digestibility in the growing pig. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 79 (4): 301-307.
- Van Barneveld, R. J., E. S. Batterham and B. W. Norton. 1994. The effect of heat on amino acids for growing pigs. *Br. J. Nutr.* 72: 221-241.
- Vázquez-Ortíz, F. A., G. Caire, I. Higuera-Ciapara y G. Hernández. 1995. High performance liquid chromatography determination of free amino acids in shrimp. *J. Liq. Chro.* 18(10): 2059-2068.
- Whittemore, C. 1998. Nutritional value of proteins and amino acids in feedstuffs for pigs. In: *The Science and Practice of Pig Production*. (2nd Ed.) Blackwell Science Ltd. London. Pp. 308-321.